



## Úvodní slovo

Vážení kolegové,

připravili jsme pro Vás letní číslo našeho bulletinu. Ve světle ukončování a zahajování činností elektronických projektů zdravotních pojišťoven a ministerstva můžeme s jistotou tvrdit, že naše zkušenosti s využíváním elektronického přenosu dat mezi vašimi ambulancemi a naší laboratoří extrémně stoupá. Nyní využívá elektronický přenos výsledků z naší laboratoře do ambulantního software více než 300 kolegů, resp. zdravotnických zařízení. Co nás těší ještě více je zvyšující se zájem o využívání naší elektronické žádanky. Tento produkt umožňuje definici vlastních žádanek, evidenci požadovaných vyšetření, omezuje chybovost při přepisu elektronické žádanky, dává informaci o cenách jednotlivých vyšetření a to i pro různé skupiny klientů - samoplátců. Tento produkt ([www.virtuallab.eu](http://www.virtuallab.eu)) poskytujeme pro naše spolupracující zdravotnická zařízení zcela zdarma a to včetně podpory našeho IT oddělení.

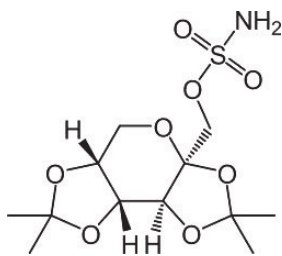
Naše laboratoř investuje! V dubnu jsme rozšířili naši biochemickou linku o další modul, čímž se zrychlilo vydávání výsledků. Instalovali jsme 4. linku kapalinové chromatografie, což nám umožňuje dále zkvalitnit analýzu lékových hladin a hormonů. Největší investicí v tomto roce je zakoupení hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF) pro naše oddělení mikrobiologie. V celé České republice je pouze 22 těchto zařízení, která slouží zejména pro přesnou a rychlou identifikaci. Na severní Moravě je naše laboratoř první, která tento systém bude již během července využívat. Další primát má naše oddělení imunologie, které jsme vybavili nejcitlivějším, v současnosti dostupným, průtokovým cytometrem. Tento přístroj je unikátní tím, že dokáže díky svým 3 laserům změřit až 10 parametrů na jednom leukocytu současně. Poslední velká investice směřovala na oddělení hematologie. Pro zvýšení kvality a zejména bezpečnosti pacientů jsme zakoupili automatický přístroj pro identifikaci krevních skupin a protilátek.

Vážení kolegové, za celou laboratoř vám přeji příjemné prožití letních dnů.

Martin Radina

## Terapeutické monitorování hladin léčiv – topiramát

Mgr. Peter Loučka, laboratoř biochemie - oddělení instrumentálních metod



**Topiramát (TPM)**, zavedený do terapie v r. 1995, je účinné antiepileptikum třetí generace syntetizované na sacharidové bázi, strukturálně tedy odlišné od všech dalších známých antiepileptik. Působí mnoha mechanismy – blokadou Na<sup>+</sup> kanálů, blokadou kainát/AMPA glutamátových recepto-

rů, zvýšením GABA aktivity, inhibicí karboanhydrázových izoenzymů, dále působí na Ca<sup>2+</sup> a K<sup>+</sup> mechanismy. TPM má široké spektrum účinnosti a je dobře snášen. Používá se v monoterapii a jako přídatná terapie parciálních a generalizovaných záchvatů, včetně syndromu Lennox-Gastaut, u dětí od 2 let věku a u dospělých. Je účinný i u těžkých myoklonických epilepsií. V monoterapii používá obvykle dávkování 100–150 mg/den, v polyterapii 200–300 mg/den. Při nižších dávkách klesá počet a závažnost NÚ. Interakce s CBZ a VPA pravděpodobně neovlivňují výskyt NÚ, není interakce s LTG, kontraceptivy. Byl popsán synergický účinek s LTG. Běžné NÚ jako somnolence, poruchy koncentrace, celkové zpomalení jsou asi stejně vyjádřené jako u CBZ. V neuropsychiatrických testech lze pozorovat ko-

gnitivní poruchy, které jsou většinou přechodné, avšak někteří pacienti je netolerují. Další vedlejší účinky jsou anorexie až astenie, urolitiáza. Nebyl prokázán vztah k hepatálnímu selhání. U malého počtu pacientů byl popsán topiramátový okulární syndrom: akutní bilaterální myopie, bolest oka, vznikl vždy v 1. měsíci terapie a odezněl po jejím vysazení. Většinou NÚ lze předejít postupnou titrací. Při dávce 100 mg/den v monoterapii je málo NÚ: parestezie, anorexie, pokles váhy. V experimentálních studiích na zvířatech měl TPM teratogenní efekt. V lidské populaci je zatím málo informací o užívání TPM během gravidity. V roce 2003 byl TPM registrován v ČR pro profylaktickou terapii migrény. Nové testované indikace jsou psychiatrická onemocnění, obezita, diabetes (TPM byl původně vyvíjen jako antidiabetikum). Vzhledem k širokému spektru účinků je považován za kandidáta na neuroprotektivum.

Metabolismus a exkrece TPM jsou závislé na věku. Plazmatická clearance je u kojenců a dětí přibližně o 50% vyšší než u dospělých. Plazmatické koncentrace v ustáleném stavu pro stejné dávky na jednotku tělesné hmotnosti jsou přibližně o 33% nižší u dětí, než u dospělých.

... pokračování na str. 2

... pokračování ze str. 1

U starších pacientů (65-85 let) dochází ke snížení clearance v souvislosti se zhoršením renálních funkcí. Jak lehké či těžké selhání ledvin, tak i postižení jater vedou k významnému snížení clearance a prodloužení eliminačního poločasu.

Protože je TPM ve většině případů podáván jako „add-on“ terapie, je důležité znát interakce s ostatními AED. TPM téměř neovlivňuje hladiny ostatních AED, zatímco jeho vlastní metabolismus může být jinými AED silně ovlivněn. K autoindukci metabolismu TPM nedochází. TPM nemá významný vliv na plazmatické koncentrace CBZ, jeho metabolitu epoxy-CBZ, PBT, PRM, VPA a LTG. U některých pacientů, užívajících TPM v kombinaci s PHE, obzvláště pokud byl PHE užíván ve dvou denních dávkách, bylo pozorováno zvýšení hladiny PHE, vysvětlované inhibicí CYP2C19 topiramátem. CBZ, PHE a PBT indukují metabolismus TPM a snižují jeho koncentrace až o 40-50%, což může vyžadovat úpravu dávek TPM v případech, kdy jsou tato léčiva přidána do terapie nebo pokud jsou naopak vysazována. PHE má silnější indukční efekt než PBT a CBZ, zatímco indukční efekty PBT a CBZ jsou porovnatelné. Kombinace TPM s VPA může lehce snižovat maximální plazmatické koncentrace a AUC topiramátu oproti monoterapii.

Převážná většina pacientů užívá dávku 125-400 mg/den, což odpovídá doporučenému dávkování TPM

pro dospělé (200-400 mg/den). Při těchto dávkách se koncentrace v séru před podáním léků u většiny pacientů pohybují mezi 2 a 8 mg/l. Nicméně, někteří pacienti užívají podstatně vyšší dávky TPM (až 2000 mg/den) a u nich pak může hladina před podáním dosáhnout až 27 mg/l. Střední plazmatické koncentrace TPM u pacientů s vedlejšími účinky ( $4,1 \pm 3,0$  mg/l) se příliš neliší od koncentrací u pacientů bez vedlejších účinků ( $4,7 \pm 3,3$  mg/l).

Monitorování hladin TPM je doporučováno zejména u pacientů se suspektně sníženou compliance nebo při předpokládaných změnách farmakokinetiky TPM v souvislosti s komorbiditami nebo další medikací.

**Stanovení koncentrace se provádí ze séra, pro odběr nejsou vhodné zkumavky obsahující separační gel. Odběr krve se má provádět nejlépe před užitím léku (ráno nalačno), nebo provést 2 odběry: před užitím a za 2 hodiny po užití. Referenční rozmezí pro TPM je 5-20 mg/l.**

Žádanka pro stanovení hladin léčiv a toxikologické vyšetření je dostupná ke stažení na <http://spadia.cz/download/spadia-zadanka-stanoveni-hladin-leciv.pdf>. Na žádanku je nutné uvádět údaje, které jsou použity pro farmakokinetické zhodnocení naměřené koncentrace: hmotnost a výška pacienta, poslední výsledky jaterních testů a kreatininu (nebo tyto parametry zaškrtnout na žádance), dávkování topiramátu, čas odběru, čas podání poslední dávky a údaje o další medikaci.

end

## Quantiferon v diagnostice infekce Mycobacterium tuberculosis

Mgr. Miroslava Dombrovská, laboratoř imunologie a sérologie



*M. tuberculosis* je acidorezistentní, alkalirezistentní a alkoholirezistentní aerobní mikrob s optimálním růstem při teplotě 37-38° C a dlouhou generační dobou.

tární cestou. Bránou vstupu infekce je z 80-90% dýchací ústrojí. Nejčastějším zdrojem nákazy je člověk nakažený tuberkulózou.

Obvykle postihuje plíce a dolní cesty dýchací, ale může postihovat i jiné orgánové systémy. Nově infikovaný jedinec může onemocnět během týdnů až měsíců, ale u většiny infikovaných osob klinické onemocnění neproukne.

Latentní infekce tuberkulózou (LTBI) je nepřenosné asymptomatické onemocnění, které u některých jedin-

ců perzistuje a může se rozvinout do onemocnění tuberkulózou o několik měsíců či let později. Hlavním účelem stanovení diagnostiky LTBI je zhodnotit možnosti léčby při prevenci klinického onemocnění tuberkulózou.

Běžná klinická vyšetření doplněná o vyšetření Quantiferon pomáhají odhalit nemocné, u kterých je třeba začít léčit latentní tuberkulózu před podáním imunosupresiv z oblasti biologické léčby. Tento postup pomáhá snižovat výskyt závažných komplikací biologicky cílené imunosupresivní léčby, především v revmatologii, ale i v některých oblastech onkologie.

Rizikové jsou také osoby, které přišly v poslední době do kontaktu s nemocnými infikovanými *M.tuberculosis*. U pacientů s revmatoidní artritidou, u kterých byla nasazena biologická léčba, je právě tuberkulóza jednou z nejvíce obávaných infekčních komplikací. Obvykle se jedná o reaktivaci latentní infekce, proto se vyskytuje relativně časně po zahájení léčby. Před každým zahájením léčby se doporučuje provést screeningové vyšetření, které zahrnuje anamnézu, tuberkulinový test, Quantiferon a rentgen hrudníku.

... pokračování na str. 3

... pokračování ze str. 2

### Test Quantiferon –TB Gold IT

Jedná se o nový diagnostický test, založený na metodě ELISA. Pomocí genomické a proteomické analýzy byly identifikovány dva proteiny: CFP-10 (Culture Filtrate Protein 10) a ESAT-6 (Early Secretory Antigen 6), které jsou specifické pro patogenní druhy komplexu *Mycobacterium tuberculosis*. Tyto proteiny chybějí ve všech kmenech BCG a ve většině netuberkulózních mykobakterií s výjimkou *M. kansasii*, *M. szulgai* a *M. marinum*. Osoby infikované mikroorganismem *M. tuberculosis* komplex mají obvykle ve své krvi lymfocyty, které tyto a další mykobakteriální antigeny rozpoznají. Součástí tohoto procesu rozpoznání je tvorba a sekrece cytokinu IFN- $\gamma$ . Detekce a následná kvantifikace IFN- $\gamma$  je základem tohoto testu.

Test Quantiferon TB Gold je vysoce specifický a senzitivní. Má vysokou vypovídací hodnotu i v diagnostice mimoplicních forem tuberkulózy. Výhodou testu je minimální zátěž pro pacienta. Spočívá v odběru 3 ml periferní krve.

### Odběr krve na quantiferon

Odběr se provádí do 3 zkumavek, které na požádání dodá laboratoř klinické imunologie a sérologie společně podrobnými pokyny k odběru.

Zkumavka s červeným víčkem označená TB obsahuje na vnitřním povrchu lyofilizované mykobakteriální antigeny.

Zkumavka s fialovým víčkem označená MIT obsahuje mitogen.

## Stanovení citlivosti na antimikrobiální látky

MUDr. Blanka Ochvatová, laboratoř klinické mikrobiologie

V naší laboratoři stanovujeme citlivost k antimikrobiálním látkám kvalitativní diskovou difuzní metodou, kvantitativní mikrodiluční metodou- stanovením MIC a metodou E-test.

**1. Disková difuzní metoda-** principem tohoto kvalitativního testu je postupné uvolňování antibiotik z antibiotických disků do agarové půdy, která je inokulována vyšetřovaným kmenem. Během inkubace dochází k vytvoření inhibice růstu bakterií příslušným difundujícím antibiotikem. Po doporučené době inkubace se měří tyto inhibiční zóny a naměřené hodnoty se porovnávají s referenčními hodnotami. Výsledkem je zařazení antibiotika do kategorie citlivý, rezistentní, příp. intermedie rezistentní.

**2. Kvantitativní mikrodiluční metoda-** v jamkách mikrotitrační destičky jsou v bujónu přesně definované koncentrace antibiotik v ředění dvojnásobnou geometrickou řadou. Po inokulaci standardním množstvím testovaného kmene a následné inkubaci se odečítá hodnota MIC / minimální inhibiční koncentrace/ tj. nejnižší koncentrace antibiotika, která inhibuje viditelný růst



Zkumavka se šedým víčkem označená NIL je prázdná a slouží jako kontrola.

Zkumavky je nutné dopravit do laboratoře k dalšímu zpracování co nejdříve, nejdéle však do 16 hodin od odběru! Do doby transportu je nutné vzorky skladovat při pokojové teplotě.

Negativní výsledek testu QuantiFERON-TB Gold® IT nevyklučuje možnost infekce *M. tuberculosis* nebo omezení tuberkulózy: falešně negativní výsledky mohou být způsobeny např. souběžnými chorobami, stádiem infekce nebo nesprávnou manipulací se zkumavkami po odběru krve.

Pozitivní výsledek QuantiFERON-TB Gold® IF by neměl být jediným nebo základním důvodem pro stanovení diagnózy a měl by být provázen dalším klinickým vyšetřením a diagnostickým hodnocením k diagnostice aktivní tuberkulózy.

end

bakterií. Tato hodnota se porovnává s break pointem / hraniční hodnotou/ daného antibiotika u testovaného kmene. Touto metodou jsou bakteriální izoláty řazeny do kategorie citlivý nebo rezistentní k antibiotikům podle stanovené hodnoty MIC, která se udává v mg/l.

**3. E-testy-** jsou kombinací dvou předchozích metod. Zdrojem antibiotika je plastický proužek opatřený stupnicí, která obsahuje antibiotikum v ředění dvojnásobnou geometrickou řadou. Tento proužek se klade na inokulovanou plotnu a po příslušné době inkubace se odečítá místo, kde zóna inhibice růstu ve tvaru elipsy protíná proužek s antimikrobiální látkou. Výsledkem je hodnota MIC udávána v mg/l.

### V naší laboratoři:

Kvantitativní stanovení citlivosti **mikrodiluční** metodou /MIC/ se preferuje především u hospitalizovaných pacientů a u multirezistentních kmenů s přirozenou nebo získanou rezistencí.

... pokračování na str. 4

... pokračování ze str. 3

Kvalitativní **disková** metoda stanovení citlivosti se volí nejčastěji u předpokládaných komunitních infekcí.

**E-testy** používáme u kmenů s vyššími kultivačními nároky a při podezření na atypickou a méně často se vyskytující rezistenci.

Tento zaužívaný postup nemusí být neměnný, je závislý od požadavků klinických lékařů a domluvy s laboratoří, vždy ovšem se zřetelem na nutnost výběru antibiotik, vhodných k terapii daného infekčního onemocnění. Antibiotika v sestavách jsou volena podle druhu infekčního agens, předpokládané rezistence, druhu vyšetřovaného materiálu a diagnózy.

Kromě vlastního stanovení citlivosti k antibiotikům je mnohdy nutné zjišťovat přítomnost konkrétních **faktorů rezistence** – od skrínigových postupů až po doporučené fenotypové metody průkazu rezistence. Jedná se o průkaz beta-laktamáz, rezistence typu  $MLS_B$  u stafylokoků a streptokoků, kmenů MRSA/ methicilin rezistentní Staphylococcus aureus /, vankomycin rezistentních enterokoků VRE, průkaz kmenů produkujících širokospektré beta-laktamázy ESBL a beta-laktamázy typu AmpC, případně jejich kombinace, fenotypové metody k detekci karbapenemáz a metalo-beta-laktamáz.. K vyloučení nebo potvrzení nejzávažnějších faktorů rezistence se využívá možnost konfirmace v NRL pro antibiotika SZÚ Praha.

Správně indikované mikrobiologické vyšetření, včetně stanovení citlivosti na antibiotika je důležitým zdrojem informací pro cílenou léčbu dané infekce. Kategorie citlivosti k antibiotikům in vitro umožňuje předpovědět jeho klinickou účinnost in vivo u konkrétního pacienta. V klinické praxi by měla být volba antibiotik individualizovaná v závislosti na lokalizaci infekčního procesu, vlastnostech makro a mikroorganismu a vlastnostech jednotlivých antibiotik.

Pro mikrobiologické vyšetření je důležitý správný odběr materiálu včetně jeho načasování. Pokud je to možné, je vhodné provést primární odběr materiálu před nasazením antibiotické léčby. Údaje o současné nebo předcházející léčbě antibiotiky, včetně alergie na antibiotika jsou důležitými informacemi pro mikrobiologickou laboratoř.

end

### Molekulární diagnostika mikrodelecí Y chromozómu

Mgr. Marie Pěničková, MVDr. Silvia Balušíková, RNDr. Jiří Sobotka, laboratoř lékařské genetiky

Předpokládá se, že v současné době je přibližně 15-20 % párů postiženo neplodností. Muž se na neplodnosti páru podílí přibližně v polovině případů. Mužská neplodnost může být způsobena jednak faktory získanými – prodělaní zánětlivých onemocnění varlat, horečnaté choroby, úrazy, životní styl a jednak faktory vrozenými. Nejčastější molekulárně-genetickou příčinou mužské neplodnosti jsou delece AZF lokusu na dlouhém raménku Y chromozómu (Yq11.3). Oblast AZF je rozdělena do tří podoblastí označovaných AZFa, AZFb a AZFc. Geny vyskytující se v těchto oblastech se účastní procesu spermatogeneze, tvorby spermií, a jsou nezbytné pro mužskou reprodukci. Mikrodelece v oblasti AZF jsou pravděpo-

dobně zodpovědné na mužskou infertilitu a byly nalezeny u 7,3 % infertilních mužů.

Laboratoř Spadia nyní zavedla molekulární diagnostiku mikrodelecí Y chromozómu. Diagnostika je založena na PCR amplifikaci STS (sekvenční specifická místa) oblastí chromozómu Y - AZFa, AZFb a AZFc. Amplifikace probíhá v jedné multiplex PCR reakci. Zvolené STS primery odpovídají doporučení uvedeném v „Návrhu laboratorní směrnice pro molekulární diagnostiku Y chromozómu v České republice (na základě doporučení směrnice EMQN)“ (B. Ravčuková, Oddělení lékařské genetiky, FN Brno). Součástí amplifikace je interní kontrola založená na identifikaci genu ZFX/ZFY, který amplifikuje jednotný fragment u muže i ženy, a genu SRY (testes určujícího faktoru), pokud gen ZFY chybí. Po amplifikaci následuje identifikace produktů kapilární elektroforézou. Přítomnost produktů amplifikovaných pomocí STS primerů indikuje přítomnost sledovaných oblastí, naopak absence produktů indikuje delecí ve sledovaných oblastech Y chromozómu.

O indikaci k molekulární diagnostice mikrodelecí Y chromozómu rozhoduje klinický genetik, indikací může být neplodnost páru, azoospermie či oligospermie u mužů. Význam diagnostiky mikrodelecí Y chromozómu je velký. Snižuje počet mužů, kteří jsou léčeni pro neplodnost bez známé etiologie, čímž lze předcházet neefektivní hormonální léčbě, případně zbytečným operačním výkonům.

Vyšetření provádíme z nesrážlivé periferní krve, odebrané do zkumavky s EDTA (jako na krevní obraz). Po odběru vzorku je nutno jej uchovávat při teplotě 2-8°C a odeslat co nejdříve do laboratoře. Výsledek poskytujeme do 10 dnů od příjmu vzorku.

end

Telefonní seznam SPADIA LAB			
Jméno	Funkce	Pevná	Mobil
Příjem 1		599 524 800	
Příjem 2		599 524 802	
Odběry		599 524 801	
Biochemie		599 524 803	
Hematologie		599 524 804	
Imunologie		599 524 805	
Instrumentální metody		599 524 806	
Mikrobiologie		599 524 809	
Kancelář 1	Laboratoř SPADIA	599 524 807	
Kancelář 2	Laboratoř SPADIA	599 524 808	
Radina Martin, RNDr.	Ředitel SPADIA LAB a.s.	556 794 141	737 276 890
Kučerová Marcela, RNDr.	Odborný pracovník biochemie	556 794 142	602 550 047
Minář Jakub, Ing.	Odborný pracovník biochemie	599 524 808	734 424 649
Gotzmannová Dagmar, RNDr.	Odborný pracovník biochemie	599 524 807	724 969 324
Richter Michal, Mgr.	Odborný pracovník biochemie	599 524 803	734 236 521
Loučka Peter, Mgr.	Odborný pracovník IM	599 524 806	724 939 889
Polok Rajska Magdalena, Mgr.	Odborný pracovník IM	599 524 806	734 642 081
Hrabcová Renáta, Mgr.	Odborný pracovník hematologie		724 340 778
Šimprová Petra, Mgr.	Odborný pracovník hematologie	599 524 804	737 276 887
Masarovičová Petra, Mgr.	Odborný pracovník imunologie	596 524 805	737 276 899
Martinek Jan, Mgr.	Odborný pracovník imunologie		602 194 040
Taichmanová Zuzana, MVDr.	Odborný pracovník mikrobiologie	599 524 809	724 314 303
Mol. biologie - Balušíková MVDr.	Odborný pracovník mol. biologie	556 794 232	734 696 595
Cytogenetika - Sobotka, RNDr.	Odborný pracovník cytogenetika	556 794 236	734 693 916
Gotzmann Josef, Ing.	Tech.-adm. pracovník		737 932 823
Trojková, Pavelcová, Španihelová	SPADIA - Frenštát	556 801 558	737 276 883
Šafarčíková Jindra, RNDr.	SPADIA - Hlučín	595 041 061	737 276 895
Alešová, Falharová	SPADIA - Bílovec	595 172 393	734 767 833
Šolcová Lenka, DiS.	SPADIA - Opava		734 767 833
Olbertová, Lipšajová, Vychodilová	SPADIA - Nový Jičín	556 794 200 - 1	
IT oddělení		556 794 120 - 2	